12 月 December
2020, 63(12): 1431 –1440

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

http://www.insect.org.cn
doi: 10.16380/j.kcxb.2020.12.001

二化性家蚕滞育、非滞育和即时浸酸卵中糖代谢相关酶 mRNA 水平和活性的变化

许 瑾[1], 蒋 涛[1], 薛 鹏[1], 沈广胜[1], 黄静怡[1], 朱 娟[1,2],
王梅仙[1,2], 唐顺明[1,2], 沈兴家[1,2,*]

(1. 江苏科技大学生物技术学院, 江苏省蚕桑生物学与生物技术重点实验室, 江苏镇江 212018;
2. 中国农业科学院蚕业研究所, 农业农村部蚕桑遗传改良重点实验室, 江苏镇江 212018)

摘要:【目的】探究家蚕 *Bombyx mori* 胚胎发育早期卵内糖代谢与滞育的关系。【方法】以家蚕二化性品种"秋丰"活化越年卵为材料,一部分于 17℃暗催青,孵化后常规饲养,制备非滞育命运卵(ND);另一部分于 25℃明催青,孵化后常规饲养,制备滞育命运卵(DD),再用盐酸溶液处理部分 DD 卵制备即时浸酸卵(IA)。在卵产下或浸酸后 0, 2, 6, 12, 24, 48, 72 和 96 h 分别取样,利用 qRT-PCR 测定家蚕卵中己糖激酶(hexokinase, HK)、磷酸果糖激酶(phosphofructokinase, PFK)、山梨醇脱氢酶(sorbitol dehydrogenase, SDH)、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK)和海藻糖酶(trehalase, TRE)5 种糖代谢相关酶基因的 mRNA 表达水平,利用紫外-可见分光光度法测定家蚕卵中这 5 种酶的活性。【结果】家蚕糖酵解途径关键酶己糖激酶(BmHK)和磷酸果糖激酶(BmPFK),以及糖分解代谢关键酶山梨醇脱氢酶(BmSDH-1)和海藻糖酶(BmTRE)在 ND 和 IA 中的 mRNA 水平和活性均普遍高于在 DD 中的;而糖异生途径相关的磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(BmPEPCK)在 DD 中的 mRNA 水平和活性均高于在 ND 和 IA 中的。【结论】结果提示,DD 因胚胎滞育的需要,胚胎发育早期卵内糖代谢以能量和物质的贮存为主;而 ND 和 IA 由于胚胎发育进程较快,糖代谢以物质分解代谢为主。本研究初步揭示了家蚕卵内糖代谢与滞育的关系,有助于更好地理解家蚕滞育的分子机制。

关键词: 家蚕; 卵; 滞育; 糖代谢; 转录水平; 酶活性

中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2020)12-1431-10

Changes in the mRNA levels and activities of carbohydrate metabolism-related enzymes in the diapause-destined, non-diapause-destined and immediately acid-treated eggs of the bivoltine silkworm (*Bombyx mori*)

XU Jin[1], JIANG Tao[1], XUE Peng[1], SHEN Guang-Sheng[1], HUANG Jing-Yi[1], ZHU Juan[1,2], WANG Mei-Xian[1,2], TANG Shun-Ming[1,2], SHEN Xing-Jia[1,2,*] (1. Jiangsu Key Laboratory of Sericutural Biology and Biotechnology, College of Biotechnology, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang, Jiangsu 212018, China; 2. Key Laboratory of Silkworm and Mulberry Genetic Improvement, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang, Jiangsu 212018, China)

Abstract:【Aim】To clarify the relationship between carbohydrate metabolism and diapause during the early embryonic developmental stage in *Bombyx mori*.【Methods】The activated hibernating eggs of

基金项目: 国家自然科学基金项目(31672490); 江苏省自然科学基金项目(BK20191226); 江苏省研究生科研实践与创新项目(KYCX19_1716)

作者简介: 许瑾, 女, 1994 年 12 月生, 河南杞县人, 硕士研究生, 研究方向基因表达调控, E-mail: 1050781640@qq.com

[*] 通讯作者 Corresponding author, E-mail: shenxjsri@163.com

收稿日期 Received: 2020-02-23; 接受日期 Accepted: 2020-05-19

bivoltine *B. mori* strain Qiufeng were used as materials. Some were incubated under 17℃ in darkness and fed normally to produce the non-diapause-destined eggs (ND), and others were incubated under 25℃ in natural circadian rhythm and fed normally to produce the diapause-destined eggs (DD), part of which were further treated with HCl solution to produce the immediately acid-treated eggs (IA). Samples were collected at 0, 2, 6, 12, 24, 48, 72, and 96 h, respectively, after oviposition or acid treatment. The mRNA levels of genes of five carbohydrate metabolism-related enzymes including hexokinase (HK), phosphofructokinase (PFK), sorbitol dehydrogenase (SDH), phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) and trehalase (TRE) in *B. mori* eggs were detected by qRT-PCR, and the activities of the five enzymes in *B. mori* eggs were assayed by ultraviolet visible spectrophotometry.【Results】The overall mRNA levels and activities of the key enzymes of glycolysis, hexokinase (BmHK) and phosphofructokinase (BmPFK), and the key enzymes of glycometabolism, sorbitol dehydrogenase (BmSDH-1) and trehalase (BmTRE), in ND and IA of *B. mori* were higher than those in DD, while the mRNA levels and activities of phosphoenolpyruvate carboxykinase (BmPEPCK) related to gluconeogenesis in DD were higher than those in ND and IA.【Conclusion】The results suggest that in the early embryonic developmental stage of DD, carbohydrate metabolism is mainly towards energy and material storage for diapause, while in ND and IA, carbohydrate metabolism is mainly towards material catabolism due to fast embryonic development. This study has preliminarily uncovered the relationship between carbohydrate metabolism and diapause of *B. mori*, being beneficial to better understand the molecular mechanisms of diapause of *B. mori*.

Key words: *Bombyx mori*; egg; diapause; carbohydrate metabolism; transcriptional level; enzymatic activity

滞育是指昆虫在卵、幼虫、蛹等不同发育时期所发生的个体发育进度变缓慢的现象(Renfree, 2015),是昆虫对环境条件长期适应的结果。滞育不仅能够帮助昆虫度过恶劣的生存环境,维持种群的生存,而且可以促使种群发育整齐,增加其交配的机会,有利于种群的繁衍(王力刚等, 2011)。

家蚕 *Bombyx mori* 是典型的以卵滞育的昆虫,在原肠胚阶段发生滞育(Yamashita and Yaginuma, 1991)。研究表明,对二化性家蚕在胚胎阶段进行25℃催青,其子代为滞育命运卵;15℃催青,其子代为非滞育命运卵;20℃催青并进行长光照,子代为非滞育命运卵,短光照则子代为滞育命运卵(Nakagaki *et al*., 1991)。家蚕胚胎在发育过程中伴随着大量的细胞分裂和生长,其中,具有滞育命运的家蚕卵在产下后 72 h(25℃)细胞分裂速度变缓并维持在 G2 期,进而逐渐开始进入滞育状态(梁瀚清等, 2014)。家蚕卵一旦进入滞育,只有经过一定的化学或物理刺激如浸酸、摩擦等才能解除滞育。

滞育的发动和解除伴随着大量代谢活动的进行(吴华静, 2018)。糖代谢是家蚕发育过程中存在较为广泛的一种基础代谢,包括糖的分解代谢和合成代谢,主要涉及糖酵解、柠檬酸循环、磷酸戊糖循环和糖异生等途径,而这些途径又是由一系列酶促反应构成的。例如,在糖酵解途径中己糖激酶(hexokinase, HK)能够促进磷酸基团的转移,将葡萄糖磷酸化生成 6-磷酸葡萄糖,HK 活性的升高有助于家蚕胚胎的发育,是家蚕发育的关键调节剂(Lin and Xu, 2016);磷酸果糖激酶(phosphofructokinase, PFK)负责催化 6-磷酸果糖磷酸化生成 1,6-二磷酸果糖,是家蚕卵在滞育过程中糖原分解为终产物甘油或海藻糖时起主要作用的酶(Kageyama and Ohnishi, 1971)。在糖异生途径中,磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK)可以推动草酰乙酸进一步转变为磷酸烯醇式丙酮酸,进而促进丙酮酸异生为葡萄糖,使得葡萄糖作为能源物质在漫长的滞育期被缓慢利用(王涛, 2018);家蚕山梨醇脱氢酶(sorbitol dehydrogenase, SDH)是调节山梨醇代谢的关键酶,山梨醇和甘油能作为防冻剂帮助蚕卵度过冬天寒冷的环境条件,随着滞育的终止,山梨醇在 SDH 催化下转化为糖原,为细胞生长提供能量(蒋涛等, 2017)。海藻糖酶(trehalase, TRE)能够水解海藻糖生成葡萄糖,而葡萄糖是家蚕进行糖酵解的原料,TRE 对海藻糖代谢和家蚕卵的越冬、滞育、几丁质

的合成以及竞争适应有关(沈兴家等, 2016)。但是,家蚕的滞育性与卵内糖代谢反应关联性的研究仍较少,尚不清晰。

为了探究家蚕胚胎发育早期卵内糖代谢与滞育的关联性,了解家蚕胚胎发育早期卵内糖代谢相关酶的表达调控特性,本研究以家蚕二化性品种“秋丰”为材料,制备滞育命运卵(diapause-destined eggs, DD)、非滞育命运卵(non-diapause-destined eggs, ND)和即时浸酸卵(immediately acid-treated eggs, IA),分别从基因转录水平和酶活性水平分析了家蚕胚胎发育早期卵内几种糖代谢相关酶表达水平的变化,以期为深入阐明家蚕的滞育机制提供参考。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

家蚕二化性品种“秋丰”由本实验室保存。以家蚕二化性品种“秋丰”活化越年蚕卵(丙 2 期胚胎)为材料,一部分蚕卵采用 17℃暗催青,孵化后常规新鲜桑叶饲养,羽化后蛾区内交配产卵,制备非滞育命运卵(ND);另一部分卵 25℃明催青,孵化后常规新鲜桑叶饲养,羽化后蛾区内交配产卵,制备滞育命运卵(DD)。将一部分 DD 在产下后经 25℃保护 20 h,随后用密度 1.075 g/mL、温度为 46℃的盐酸溶液浸泡 5 min,漂洗后获得即时浸酸卵(IA),IA 从浸酸后计算其发育时间。IA 在浸酸前的发育同 DD,为滞育发育;浸酸后打破蚕卵滞育,胚胎继续发育,与 ND 类似。3 种家蚕卵分别在卵产下或即时浸酸后 0, 2, 6, 12, 24, 48, 72 和 96 h 取样, -80℃保存备用。

1.2　主要试剂

TRIzon 总 RNA 提取试剂盒、HiFiScript gDNA Removal RT MasterMix 反转录试剂盒和 UltraSYBR Mixture 试剂盒均购自江苏康为世纪生物科技有限公司,酶活性检测试剂盒购自苏州科铭生物有限公司。

1.3　cDNA 合成

1.1 节中 ND, DD 和 IA 3 种家蚕卵样品分别称取 0.100 g,用液氮研磨,加入 TRIzon 提取总 RNA,电泳检测总 RNA 质量,反转录合成 cDNA, -20℃保存备用。

1.4　qRT-PCR 检测

利用 Oligo 7.0 软件根据家蚕基因组中的基因序列设计引物(表 1),引物委托浙江尚亚生物技术有限公司合成。选择家蚕己糖激酶基因 *BmHK* (GenBank 登录号: XM_004923446)、磷酸果糖激酶基因 *BmPFK* (GenBank 登录号: NW_004582016.1)、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶基因 *BmPEPCK* (GenBank 登录号: XM_021353172)、山梨醇脱氢酶基因 *BmSDH*-1 (GenBank 登录号: D13371)和海藻糖酶基因 *BmTRE* (GenBank 登录号: S73271)进行 qRT-PCR 检测,以家蚕 *BmActin*-3 (GenBank 登录号: X04507)为内参基因。

表 1　qRT-PCR 引物
Table 1　qRT-PCR primers

基因 Genes	引物序列(5′-3′) Primer sequences
BmHK	F: CGGAATGGACGGGGTTGATGTG R: CAGCGACCAGAGTGCCAGTTG
BmPFK	F: GCGGCTCTCATAAAGGCAAGGG R: ACTGATCGCACAGCGGCATTC
BmPEPCK	F: GGGTGGGGTGTGGTGGGAAG R: TGGATGTGCAGCCGGAGTTTTC
BmSDH-1	F: GGTGTTGGTGGTCGGCATAGC R: AGGGCGGGCTGGTACGTG
BmTRE	F: CGCCGACTTGCATCAGACCAG R: GGCGGACAGTGTTGCGTTCTC
BmActin-3	F: CAAGGCCAACAGAGAGAAGA R: GATGGTGATGACCTGACCGT

反应体系(20 μL): 2×SYBR Premix Ex Taq Ⅱ 10.0 μL, 50×ROX Reference Dye 0.4 μL, cDNA 溶液 2.0 μL,正反向引物(10 μmol/L)各 0.8 μL, ddH_2O 6.0 μL。扩增程序: 95℃ 5 min; 95℃ 10 s, 60℃ 30 s, 共 40 个循环。设置 3 个生物学重复。在LightCycler® 96 荧光定量 PCR 仪(Roche)上运行。基因的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。

1.5　糖代谢相关酶的提取和活性测定

(1)将酶基因名称输入 UniProt 网站(https://www.uniprot.org/database),获得该酶基因的登录号(见 1.4 节);(2)将酶基因登录号输入 NCBI 网站(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/proteins/)中进行查阅,General protein information 部分会显示出该酶蛋白的酶学编号;(3)根据酶学编号,选择酶活性检测试剂盒,以确保所测定的酶与酶基因完全对应。取 1.1 节中 ND, DD 和 IA 3 种家蚕卵样品分别称取 0.100 g,用电动组织匀浆器进行冰浴匀浆,提取粗酶后用紫外分光光度法(Zhao and Shi, 2010)分别测定家蚕己糖激酶(HK, EC 2.7.1.1)、磷酸果糖激酶(PFK, EC 2.7.1.11)、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PEPCK, EC 4.1.1.32)、山梨醇脱氢酶(SDH-1, EC 1.1.1.14)和海藻糖酶(TRE, EC 3.2.1.28)的活性,进行 3 次独立试验。其中,HK 的活性单位为每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 nmol 的

NADPH；PFK 的活性单位为每 mg 组织蛋白每分钟消耗 1 nmol 的 NADH；PEPCK 的活性单位为每 mg 组织蛋白每分钟消耗 1 nmol NADH；SDH-1 的活性单位为每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 nmol NADH；TRE 的活性单位为每 mg 组织蛋白每分钟催化生成 1 nmol 葡萄糖。

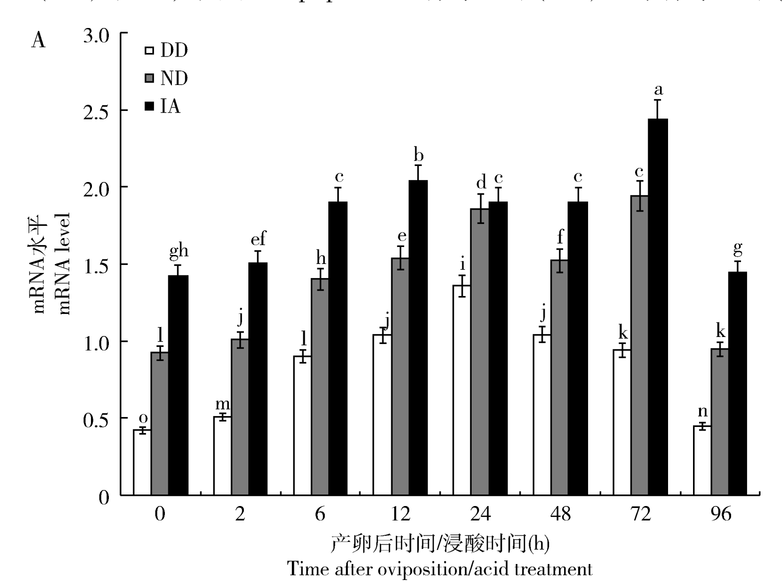
1.6 数据分析

应用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析，实验数据用平均数 ± 标准误（*SE*）表示，采用 Graphpad Prism 5.0 和 Excel 软件作图，采用 Duncan 氏多重比较方法检验 3 组蚕卵间差异显著性，$P < 0.05$ 则认为差异显著。

2 结果

2.1 BmHK 的 mRNA 水平和活性的变化

从 qRT-PCR 分析结果（图 1：A）可以看出，0 ~ 96 h 内，BmHK 基因在家蚕即时浸酸卵（IA）、非滞育命运卵（ND）和滞育命运卵（DD）中的表达水平始



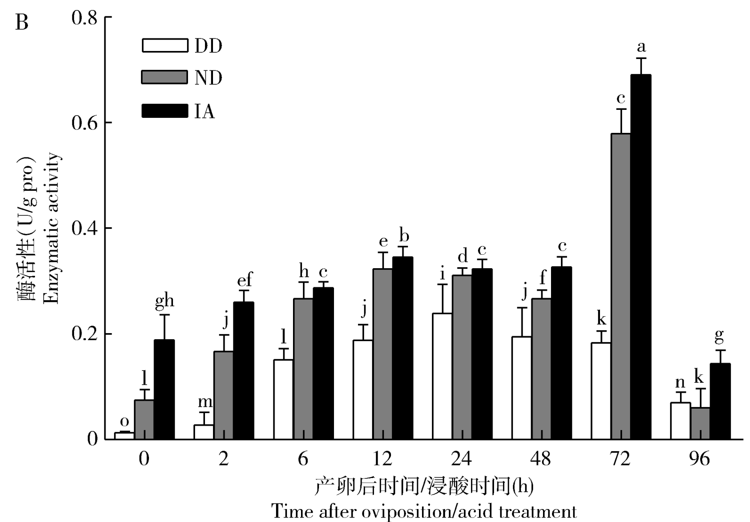


图 1 家蚕滞育命运卵（DD）、非滞育命运卵（ND）和即时浸酸卵（IA）中 BmHK 的 mRNA 水平（A）和活性（B）

Fig. 1 mRNA levels (A) and activities (B) of BmHK in the diapause-destined eggs (DD), non-diapause-destined eggs (ND) and immediately acid-treated eggs (IA) of *Bombyx mori*

二化性家蚕卵分别以 17℃暗催青，孵化后常规饲养，制备非滞育命运卵（ND）；25℃明催青，孵化后常规饲养，制备滞育命运卵（DD）卵和即时浸酸卵（IA）。在卵产下或即时浸酸后 0, 2, 6, 12, 24, 48, 72 和 96 h 分别取样。不同蚕卵中的 mRNA 水平以 0 h DD 中的表达量为基准。图中数据为平均值 ± 标准误；柱上不同字母表示经 Duncan 氏多重比较后差异显著（$P < 0.05$）。The eggs of bivoltine *B. mori* strain were incubated under 17℃ in darkness and fed normally to make non-diapause-destined eggs (ND). In the other group, eggs were incubated under 25℃ in natural circadian rhythm and fed normally to make diapause-destined eggs (DD) and immediately acid-treated eggs (IA), respectively. Samples were collected at 0, 2, 6, 12, 24, 48, 72, and 96 h, respectively, after oviposition or being immediately acid-treated. The mRNA levels in different kinds of eggs were normalized to those in the diapause-destined eggs at 0 h. Data in the figure are mean ± *SE*, and different letters above bars mean significant difference by Duncan's multiple range test ($P < 0.05$). 下图同 The same for the following figures.

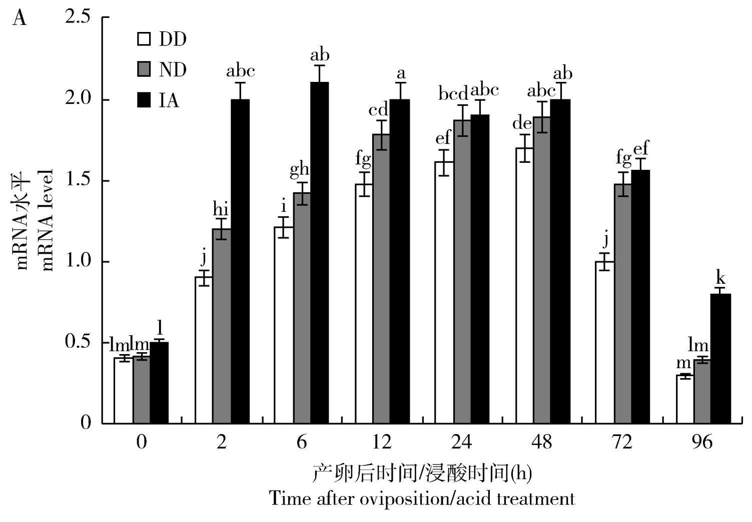
终是 IA > ND > DD，DD 中的与 IA 和 ND 中的差异显著（$P < 0.05$），其中 DD 中 *BmHK* 的表达水平最低，在 0 – 24 h 呈现逐渐上升趋势，24 h 后逐渐下调；ND 中 *BmHK* 的表达水平处于中间，在 0 – 24 h 呈现逐渐上调的趋势，但在 48 h 时有所下降，72 h 时再次上升并达到峰值，96 h 时下调至最低值；IA 中 *BmHK* 的表达水平最高，在 6 h 时就达到较高水平，72 h 时上升至最高值，然后开始下降。

BmHK 活性测定结果（图 1：B）与 qRT-PCR 结果吻合，家蚕 IA，ND 和 DD 中 BmHK 活性始终是 IA > ND > DD，且 DD 中的与 IA 和 ND 中的差异显著（$P < 0.05$）。BmHK 活性在 DD 中呈现出"上升-下降"的趋势，在 24 h 时活性最高；在 IA 和 ND 中都呈现出"上升-下降-上升-下降"的趋势，尤其是在 72 h时活性最高。

2.2　BmPFK 的 mRNA 水平和活性的变化

qRT-PCR 分析结果（图 2：A）显示，*BmPFK* 在家蚕即时浸酸卵（IA）、非滞育命运卵（ND）和滞育命运卵（DD）中的表达水平为 IA > ND > DD，其中 DD 和 ND 中 *BmPFK* 表达水平相对较低且变化趋势相似，即在 0 – 48 h 逐渐上升，48 h 后逐渐下降；IA 中 *BmPFK* 的表达在浸酸处理后 2 h 时迅速上调，与浸酸前(0 h)差异显著（$P < 0.05$），且在 12 – 48 h 内维持高水平，在 72 h 开始表达水平逐渐下降。

BmPFK 活性变化趋势（图 2：B）与 qRT-PCR 结果基本一致，在 DD 中呈波动式变化，在 ND 中呈现"上升-下降"的变化趋势，在 IA 中呈现"上升-平稳-下降"的变化趋势。



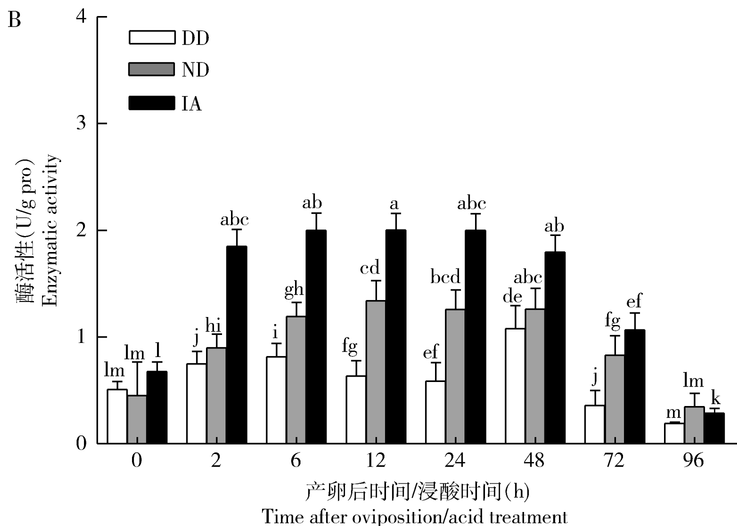


图 2　家蚕滞育命运卵（DD）、非滞育命运卵（ND）和即时浸酸卵（IA）中 BmPFK 的 mRNA 水平（A）和活性（B）

Fig. 2　mRNA levels (A) and activities (B) of BmPFK in the diapause-destined eggs (DD), non-diapause-destined eggs (ND) and immediately acid-treated eggs (IA) of *Bombyx mori*

2.3 BmPEPCK 的 mRNA 水平和活性的变化

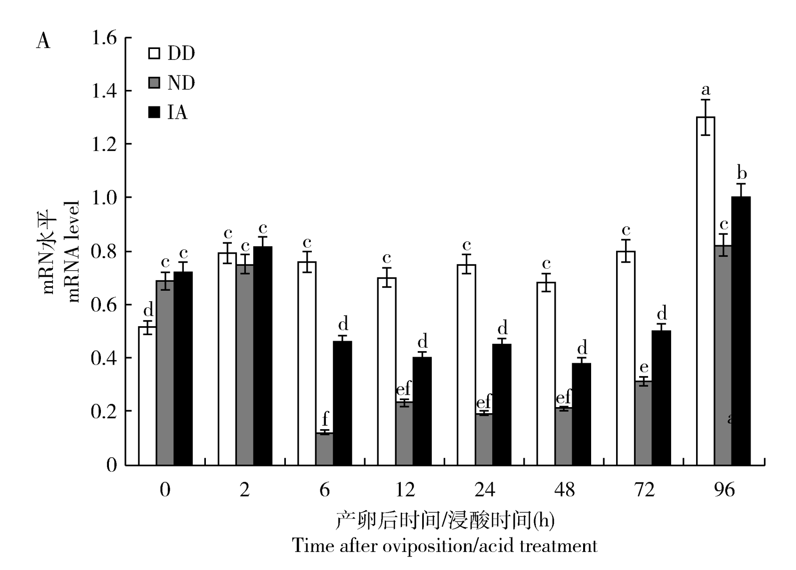
qRT-PCR 分析结果(图 3: A)显示,*BmPEPCK* 在家蚕即时浸酸卵(IA)、非滞育命运卵(ND)和滞育命运卵(DD)的表达水平为:在 DD 中 0-72 h 变化不大,96 h 显著升至最高值($P<0.05$);在 ND 中 0-2 h在较高水平,6-72 h 降低并稳定在低水平,72 h 后显著升高($P<0.05$);在 IA 中 0-2 h 表达水平较高,6-72 h 降低并稳定在低水平,96 h 后达到峰值。

BmPEPCK 活性测定结果(图 3: B)与 *BmPEPCK* 表达水平的变化趋势较一致,且在 3 种家蚕卵的变化趋势也较一致,呈现出“上升-下降-上升”的变化趋势。

2.4 BmSDH-1 的 mRNA 水平和活性的变化

qRT-PCR 分析结果(图 4: A)显示,*BmSDH*-1 在家蚕即时浸酸卵(IA)、非滞育命运卵(ND)和滞育命运型卵(DD)中表达水平为 IA > ND > DD,其中在 DD 中的为先下降后上升,6-48 h 趋于平稳,从 72 h 后逐渐下调;在 ND 中的为先上升,12-48 h 趋于平稳,从 72 h 后逐渐上调;在 IA 中的为 2 h 时迅速显著上调并维持在高水平,96 h 时再次显著上调($P<0.05$)。

BmSDH-1 在家蚕 IA, ND 和 DD 中活性测定结果(图 4: B)与 qRT-PCR 结果一致,为 IA > ND > DD,在 DD 中呈现出“上升-下降”的趋势;在 ND 和 IA 中为在 2 h 上升后,保持平稳。



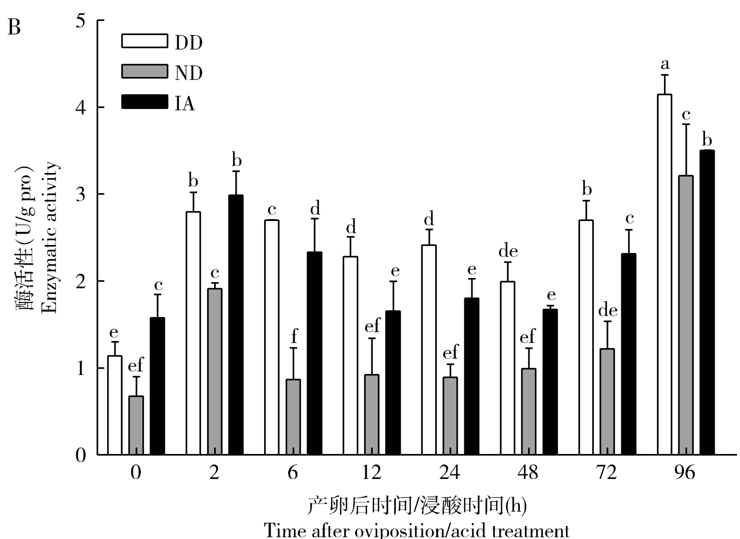
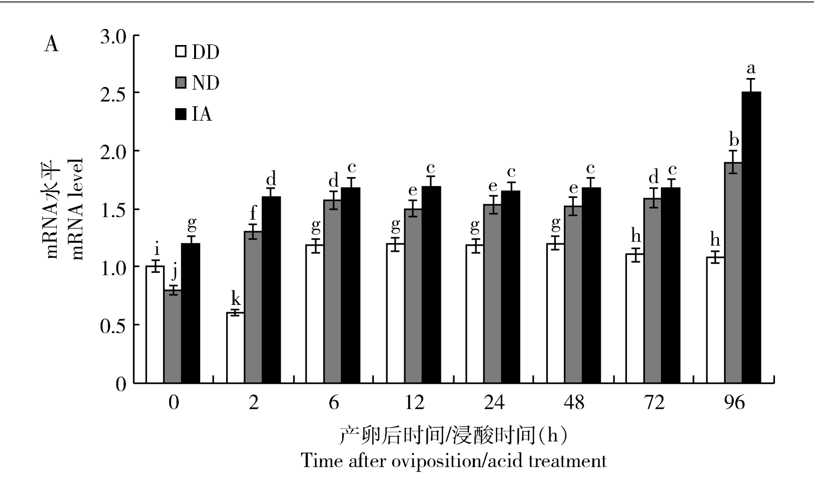


图 3 家蚕滞育命运卵(DD)、非滞育命运卵(ND)和即时浸酸卵(IA)中 BmPEPCK 的 mRNA 水平(A)和活性(B)

Fig. 3 mRNA levels (A) and activities (B) of BmPEPCK in the diapause-destined eggs (DD), non-diapause-destined eggs (ND) and immediately acid-treated eggs (IA) of *Bombyx mori*



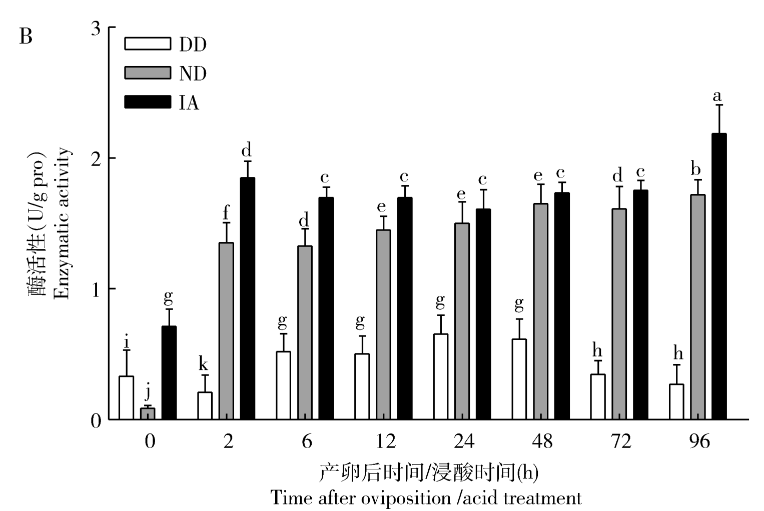


图 4　家蚕滞育命运卵(DD)、非滞育命运卵(ND)和即时浸酸卵(IA)中 BmSDH-1 的 mRNA 水平(A)和活性(B)
Fig. 4　mRNA levels (A) and activities (B) of BmSDH-1 in the diapause-destined eggs (DD), non-diapause-destined eggs (ND) and immediately acid-treated eggs (IA) of *Bombyx mori*

2.5　BmTRE 的 mRNA 水平和活性的变化

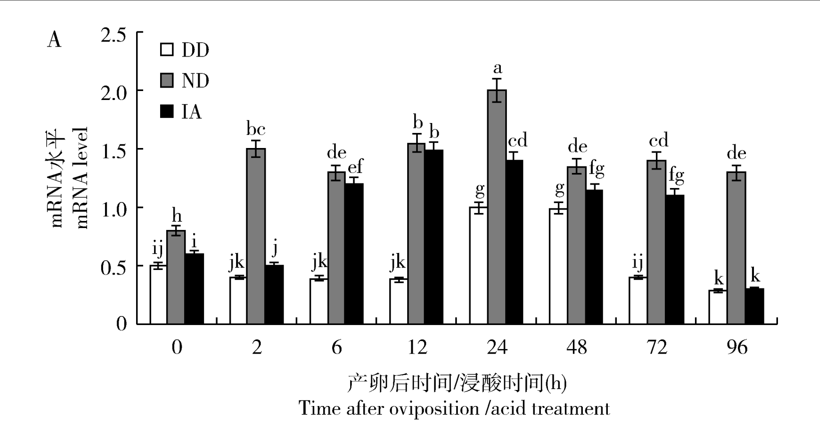
qRT-PCR 分析结果(图 5：A)显示，*BmTRE* 在家蚕即时浸酸卵(IA)、非滞育命运卵(ND)和滞育命运卵(DD)中表达水平为 ND > IA > DD，在 DD 中最低，在 0 - 12 h 和 72 - 96 h 的变化幅度较小，但在 24 - 48 h 的表达水平较高；在 ND 中的为在 0 - 24 h 基本呈现出上升趋势，24 h 后逐渐下降；在 IA 中，12 h 达到峰值，其后虽有下降，但仍维持在较高水平。

BmTRE 活性测定结果(图 5：B)与 qRT-PCR 分析结果基本一致，总体上为 ND > IA > DD，0 - 96 h 三者差异显著($P < 0.05$)，且在 12 h DD 中与在其他 2 种卵中的差异极显著($P < 0.01$)。

3　讨论

家蚕是典型的鳞翅目模式生物，根据自然条件下一年发生的世代数将家蚕分为一化性、二化性和多化性(吕鸿声，1991)，其中二化性品种子代滞育性受亲代胚胎期环境条件的调控(黄君霆，2003)。研究显示，不同滞育性蚕卵的糖代谢水平会有所不同(蒋涛等，2017)，但是对于卵内糖代谢水平与滞育的关系还没有系统的研究，为此我们分析了来自家蚕二化性品种的滞育命运卵(DD)、非滞育命运卵(ND)和即时浸酸卵(IA)中糖酵解、糖异生相关酶以及常见的昆虫特异性糖代谢相关酶的基因转录水平及活性变化。

本研究选取了糖酵解相关酶 HK 和 PFK，通过分析其在二化性家蚕不同处理蚕卵中表达水平，进一步探索了糖酵解与家蚕滞育的关联。HK 广泛存在于脊椎动物和无脊椎动物中，包括 4 种不同的亚型，在进化上高度保守并与多种生理活动密切相关(姚金美等，2016)。在本研究中，家蚕 ND 和 IA 中 BmHK 的 mRNA 水平相比 DD 中的均显著上调，且 ND 和 IA 中 BmHK 的 mRNA 水平在 72 h 达到最大



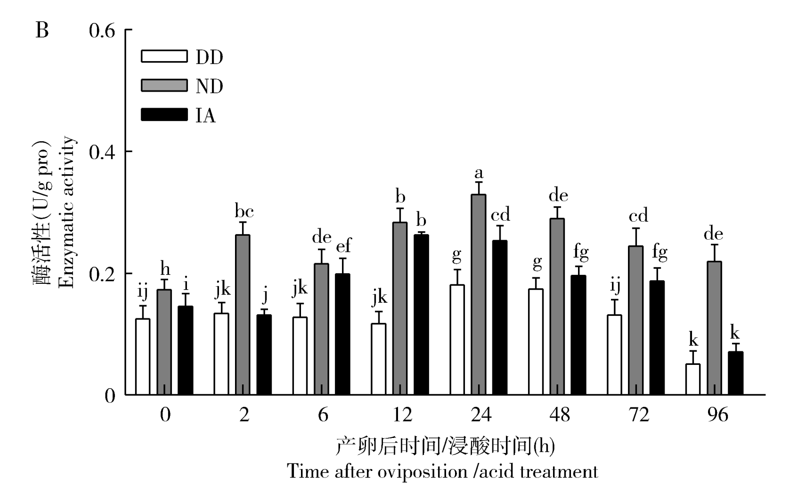


图 5　家蚕滞育命运卵(DD)、非滞育命运卵(ND)和即时浸酸卵(IA)中 BmTRE 的 mRNA 水平(A)和活性(B)

Fig. 5　mRNA levels (A) and activities (B) of BmTRE in the diapause-destined eggs (DD), non-diapause-destined eggs (ND) and immediately acid-treated eggs (IA) of *Bombyx mori*

值(图 1),说明 ND 和 IA 的胚胎发育迅速,需要通过大量的 HK 催化葡萄糖发生磷酸化,为 ATP 的生成提供底物,其体内糖酵解代谢活跃。Castro-Sosa 等(2017)在果蝇(Drosophilidae)中也发现,非滞育型蛹中 HK 表达水平显著高于滞育型蛹(李毅平等, 2000)。推测家蚕 ND 和 IA 中 BmHK 活性显著高于 DD 的原因可能与 6-磷酸葡萄糖的产生有关,研究表明,HK 能够催化葡萄糖的磷酸化,产生 6-磷酸葡萄糖,6-磷酸葡萄糖能够为糖酵解终产物丙酮酸的生成提供底物,从而促进蚕卵的发育。另外,HK 在滞育解除过程中还能催化葡萄糖转化为氨基酸、脂肪等物质,产生大量能量,促进家蚕胚胎头部和胸节的分化(范兰芬等, 2011)。李毅平等(2000)对松针瘿蚊 *Thecodiplosis japonensis* 越冬期间体内 HK 活性的研究显示滞育越冬期间 HK 的酶活力较低,这一结果与本研究结果相似,表明 HK 的表达水平和昆虫的滞育性密切相关。

PFK 是糖酵解途径的限速酶,可分为两种:PFK1 催化的产物为 1,6-二磷酸果糖,PFK2 的催化产物为果糖-2,6-双磷酸。本研究中,3 组家蚕卵的 BmPFK 表达水平有显著差异,DD 中 BmPFK 表达水平显著低于其余两种卵中的(图 2),说明 ND 和 IA 卵的胚胎需要通过糖酵解生成 1,6-二磷酸果糖和 ATP,以满足其快速发育需求。成卫宁等(2009)关于麦红吸浆虫 *Sitodiplosis mosellana* 滞育的研究也同样发现,PFK 活性在滞育前后差异显著,滞育后 PFK 活力降低,滞育解除后 PFK 活力升高。本研究中推测 ND 和 IA 中 BmPFK 表达水平显著高于 DD 的原因可能与 1,6-二磷酸的生成有关。大量试验证明,PFK 能够催化 6-磷酸果糖的磷酰基移位产生 1,6-二磷酸果糖,1,6-二磷酸果糖作为中间产物为糖酵解的底物水平磷酸化提供原料,促进 ATP 的形成,为家蚕胚胎发育提供能量。在本研究中 DD 中 BmPFK 表达水平在产卵后 48 h 时突然出现峰值(图 2),这可能与此时 DD 胚胎的胚盘快速发育成匙状胚胎(吕鸿声, 1991),出现短暂的细胞分裂速度加快,机体消耗的能量增多有关。据报道,果蝇中 *PFK* 基因的突变会对滞育的解除产生不利影响,该现象与果蝇的 *PFK* 基因中存在缺氧反应元件(HRE)有关,该元件能够在机体缺氧的条件下促进

卵黄发育，有利于滞育的解除（陶萍和吴耀生，2006；Zhai *et al.*，2016），推测家蚕 *PFK* 基因中可能也存在这样的调控元件在影响家蚕的滞育性。

PEPCK 是调节糖异生的关键酶，催化糖异生的第一步，也是限速步骤，能够协助在需要能量的活动中动员能量底物，对维持体内葡萄糖稳定至关重要（蒋雯卿，2011）。本研究中，家蚕 DD 中 BmPEPCK 的 mRNA 水平比 ND 和 IA 中的上调（图 3），推测可能与磷酸烯醇式丙酮酸合成有关，通过糖异生过程储存更多能量以满足次年解除滞育后胚胎发育的需要。

研究表明，PEPCK 能够催化草酰乙酸发生反应生成磷酸烯醇式丙酮酸，为糖异生终产物葡萄糖的生成提供反应原料，从而为滞育期胚胎的发育储备能量。严盈等（2009）发现滞育果蝇中 PEPCK 的活性显著高于非滞育果蝇，与我们的研究结果一致，证实了家蚕 DD 中发生了更高水平的糖异生反应。并且家蚕 DD 胚胎在逐渐进入滞育的过程中卵黄细胞向四周移动，以包围状态牢牢地附着在胚胎上，进而引起呼吸及其他生理变化的强度降低（Zhai *et al.*，2016），在此情境下 PEPCK 表达水平的升高可导致调动能源的速度减慢，卵内的代谢以能量的合成与贮存为主。卵内储备的能量越多，家蚕胚胎在恶劣环境中的存活时间就越长。

家蚕有 3 个 SDH 基因，即 *BmSDH*-1，*BmSDH-2a* 和 *BmSDH-2b*，均位于家蚕第 21 号染色体，家蚕卵中山梨醇含量与滞育的发动和解除有着密切的关系（朱娟等，2018），*BmSDH-2a* 与 *BmSDH-2b* 不论是基因结构还是其编码蛋白结构都有很高的相似性，*BmSDH-2a* 与 *BmSDH-2b* 的同源性高达 96.4%，亲缘关系很近；而它们与 *BmSDH*-1 的同源性只有 49.7%，亲缘关系较远，说明 *BmSDH-2a* 和 *BmSDH-2b* 可能具有相似的生理功能，而 *BmSDH*-1 则存在较大差异。本研究中，对 *BmSDH*-1 基因的表达水平进行了检测，家蚕 ND 和 IA 中 *BmSDH*-1 的表达水平比 DD 中的上调（图 4），这一结果可能与糖原的生成有关。ND 和 IA 的胚胎发育过程中需要更多的 SDH-1，将山梨醇氧化为 D-果糖，参与糖代谢过程的中间反应，产生能量以满足胚胎发育的需要。研究表明，家蚕在滞育过程中，*SDH*-1 基因的表达受到抑制，糖原大量转化为山梨醇，并在滞育卵中积累起来。山梨醇可与胚胎细胞中的自由水结合，自由水减少，使所有的活体功能停滞，从而抑制代谢水平（Niimi *et al.*，1993）。滞育解除时由于细胞分裂较快，需要消耗大量能量，SDH 催化山梨醇脱氢生成糖原，糖代谢向能源分解的方向进行。

海藻糖是家蚕卵重要的抗冻保护性物质，TRE 在调节体内海藻糖含量方面有着十分重要的作用。在本研究中，家蚕 ND 与 IA 中 BmTRE 的 mRNA 水平高于 DD 中的（图 5），推测其原因可能与葡萄糖的生成有关。ND 和 IA 发育过程中需要较多的 TRE 将海藻糖水解成葡萄糖，满足胚胎发育需要。而 DD 的海藻糖含量需要在胚胎进入滞育后维持在较高水平，从而为次年解除滞育后胚胎发育提供能量，同时提高胚胎的抗逆能力。研究表明，当家蚕卵滞育被解除时，海藻糖会在 TRE 的催化下水解为葡萄糖，作为能源物质直接被胚胎发育利用，葡萄糖也可作为糖酵解的原料进入糖酵解途径，为胚胎发育提供能量。李毅平等（2000）对松针瘿蚊的研究发现，其越冬幼虫在进入滞育的过程中 TRE 活性较低以维持体内海藻糖较高含量，当滞育被解除时，TRE 活性则升高，以分解体内积累的海藻糖，这与本研究结果相似，证实了滞育解除时需要 TRE 分解海藻糖。张顺益等（2015）对桃小食心虫 *Carposina nipponensis* 进行研究，发现桃小食心虫解除滞育后 TRE 活力显著升高，这些结果提示家蚕滞育的解除可能与 TRE 催化海藻糖的分解有关。

综上所述，不同发育命运的蚕卵中进行代谢的强度和类型不同，滞育命运卵主要偏向于能量储备，更多的进行能量和物质的贮存代谢，而非滞育命运蚕卵由于胚胎发育进程较快，更多的进行物质分解代谢，满足胚胎发育所需。本研究对糖代谢相关酶在蚕卵发育过程中表达水平变化的揭示将有助于对蚕卵滞育机制的进一步研究。

参考文献（References）

Castro-Sosa R, Castillo-Peralta MDR, Monterroso-Rivas AI, Gomez-Díaz JD, Flores-González E, Rebollar-Alviter Á, 2017. Potential distribution of *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) in relation to alternate hosts in Mexico. *Fla. Entomol.*, 100(4): 787–794.

Cheng WN, Li XL, Li YP, Li JJ, Wu JX, 2009. Activities of four sugar metabolic enzymes in *Sitodiplosis mosellana* (Gehin) (Diptera: Cecidomyiidae) larvae at different diapause stages. *Acta Entomol. Sin.*, 52(2): 133–139. [成卫宁，李修炼，李怡萍，李建军，仵均祥，2009. 麦红吸浆虫不同滞育期四种糖代谢酶活力分析. 昆虫学报，52(2)：133–139]

Fan LF, Zhong YS, Lin JR, 2011. Comparison of related enzyme activities between diapause and non-diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Entomol. Sin.*, 54(11): 1258–1263. [范兰

芬, 钟杨生, 林健荣, 2011. 家蚕滞育卵与非滞育卵中几种关键酶活性的比较. 昆虫学报, 54(11): 1258 – 1263]

Huang JT, 2003. Studies on the molecular mechanism of diapause in the silkworm, *Bombyx mori*. *Sci. Seric.*, 29(1): 1 – 6. [黄君霆, 2003. 家蚕滞育分子机制的研究. 蚕业科学, 29(1): 1 – 6]

Jiang T, Shen XJ, Tang SM, Qian P, 2017. Advances in diapause physiology and molecular mechanism of silkworm, *Bombyx mori*. *Sci. Seric.*, 43(6): 148 – 155. [蒋涛, 沈兴家, 唐顺明, 钱平, 2017. 家蚕滞育生理及其分子调控机制研究进展. 蚕业科学, 43(6): 148 – 155]

Jiang WQ, 2011. Acetylation Regulates Metabolic Pathway and Targets PEPCK1 Degradation via Recruiting the UBR5 Ubiquitin Ligase. PhD Dissertation, Fudan University, Shanghai. 75 – 77. [蒋雯卿, 2011. 乙酰化修饰调控代谢网络和磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶的机制的研究. 上海: 复旦大学博士学位论文. 75 – 77]

Kageyama T, Ohnishi E, 1971. Carbohydrate metabolism in the eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. I. Absence of phosphofructokinase in the diapausing egg. *Dev. Growth Differ.*, 13(2): 97 – 106.

Li Y, Gong H, Park HY, 2000. Profile of enzymic activity in overwintering mature larvae of the pine needle gall midge, *Thecodiplosis japonensis*. *Acta Entomol. Sin.*, 43(3): 227 – 232. [李毅平, 龚和, 朴镐用, 2000. 松针瘿蚊越冬幼虫体内酶活性的时序变化. 昆虫学报, 43(3): 227 – 232]

Liang HQ, Zhong YS, Chen FY, Yan HC, Lin JR, 2014. Research progress on insect diapause mechanism. *Guangdong Agric. Sci.*, 20(1): 84 – 90. [梁瀚清, 钟杨生, 陈芳艳, 严会超, 林健荣, 2014. 昆虫滞育机制研究进展. 广东农业科学, 20(1): 84 – 90]

Lin XW, Xu WH, 2016. Hexokinase is a key regulator of energy metabolism and ROS activity in insect lifespan extension. *Aging*, 8(2): 245 – 259.

Lv HS, 1991. The Sericultural Science in China. Shanghai Scientific and Technical Publishers, Shanghai. 525 – 536. [吕鸿声, 1991. 中国养蚕学. 上海: 上海科学技术出版社. 525 – 536]

Nakagaki M, Takei R, Nagashima E, Yaginuma T, 1991. Cell cycles in embryos of the silkworm, *Bombyx mori*: G_2-arrest at diapause stage. *Dev. Genes Evol.*, 200(4): 223 – 229.

Niimi T, Yamashita O, Yaginuma T, 1993. Developmental profile of the gene expression of a *Bombyx* homolog of mammalian sorbitol dehydrogenase during embryogenesis in non-diapause eggs. *Comp. Biochem. Physiol. B Comp. Biochem.*, 106(2): 437 – 442.

Renfree MB, 2015. Embryonic diapause and maternal recognition of pregnancy in diapausing mammals. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.*, 216(1): 239 – 252.

Shen XJ, Tang SM, Yi YZ, Zhao QL, Zhang ZF, Li YR, He JL, 2016. Characterization of trehalase gene promoters from silkworm, *Bombyx mori* and *Bombyx mandarina* and transcriptional regulatory effects of diapause hormone on them. *Sci. Seric.*, 30(2): 147 – 150. [沈兴家, 唐顺明, 易咏竹, 赵巧玲, 张志芳, 李奕仁, 何家禄, 2016. 家蚕、野桑蚕海藻糖酶基因启动子的特性及其滞育激素的转录调节. 蚕业科学, 30(2): 147 – 150]

Tao P, Wu YS, 2006. 6-Phosphofructokinase-2/fructose diphosphatase-2 is an important metabolic signal enzyme. *Chem. Life*, 26(2): 17 – 20. [陶萍, 吴耀生, 2006. 6-磷酸果糖激酶-2/果糖双磷酸酶-2是一种重要的代谢信号酶. 生命的化学, 26(2): 17 – 20]

Wu HJ, 2018. Biological Oxidation Characteristics of the Silkworm, *Bombyx mori* During Diapause Initiation. MSc Thesis, Soochow University, Suzhou, Jiangsu. 23 – 72. [吴华静, 2018. 滞育发动阶段家蚕卵的生物氧化特性. 江苏苏州: 苏州大学硕士学位论文. 23 – 72]

Wang LG, Song HT, Huang Y, Wang SP, Tang SM, Zhao QL, Shen XJ, 2011. Influence of incubation temperature on expression of diapause hormone receptor genes in bivoltine *Bombyx mori* variety and structural features of the gene. *Sci. Seric.*, 37(2): 215 – 223. [王力刚, 宋海韬, 黄勇, 汪生鹏, 唐顺明, 赵巧玲, 沈兴家, 2011. 催青温度对家蚕二化性品种滞育激素受体基因表达的影响及基因的结构特征. 蚕业科学, 37(2): 215 – 223]

Wang T, 2018. Deacetylation of Metabolic Enzymes Regulates Pupal Diapause in the Cotton Bollworm, *Helicoverpa armigera*. PhD Dissertation, Sun Yat-sen University, Guangzhou. 14 – 22. [王涛, 2018. 代谢酶去乙酰化修饰调节棉铃虫蛹滞育. 广州: 中山大学博士学位论文. 14 – 22]

Yamashita O, Yaginuma T, 1991. Silkworm Eggs at Low Temperature: Implications for Sericulture. Chapman and Hall Press, New York. 424 – 445.

Yan Y, Peng L, Liu WX, Wan FH, 2009. Research progress in insect alkaline phosphatases. *Acta Entomol. Sin.*, 52(1): 95 – 105. [严盈, 彭露, 刘万学, 万方浩, 2009. 昆虫碱性磷酸酶的研究进展. 昆虫学报, 52(1): 95 – 105]

Yao JM, Wang QL, Zhao LC, 2016. Characterization of aerobic oxidation in the silk gland of the silkworm (*Bombyx mori*) during the synthesis and secretion of silk proteins. *Acta Entomol. Sin.*, 59(1): 1 – 7. [姚金美, 王启龙, 赵林川, 2016. 丝蛋白合成和分泌期家蚕丝腺中有氧氧化特性分析. 昆虫学报, 59(1): 1 – 7]

Zhai YF, Lin QC, Zhang JP, Zhang F, Zheng L, Yu Y, 2016. Adult reproductive diapause in *Drosophila suzukii* females. *J. Pest. Sci.*, 89(3): 679 – 688.

Zhang SY, Qin HW, Ren FS, Liu TL, Chen ZZ, Men XY, Yu Y, Xu YY, Li LL, 2015. Activity changes of five metabolic enzymes in *Carposina sasakii* Matsumura during diapause. *Shandong Agric. Sci.*, 47(6): 97 – 100. [张顺益, 秦华伟, 任凤山, 刘廷利, 陈珍珍, 门兴元, 于毅, 许永玉, 李丽莉, 2015. 桃小食心虫滞育过程中5种代谢酶活力变化. 山东农业科学, 47(6): 97 – 100]

Zhao LC, Shi LG, 2010. Metabolism of hydrogen peroxide between diapause eggs and non-diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*, during chilling at 5℃. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 74(2): 127 – 134.

Zhu J, Wang X, Wei BY, Tang SM, Huang JS, Hao BF, Shen XJ, 2014. Transcriptional characteristics of sorbitol dehydrogenase gene in silkworm, *Bombyx mori*. *China Seric.*, 35(2): 4 – 7, 12. [朱娟, 王欣, 韦博尤, 唐顺明, 黄金山, 郝碧芳, 沈兴家, 2014. 家蚕山梨醇脱氢酶基因的转录水平特性分析. 中国蚕业, 35(2): 4 – 7, 12]

(责任编辑: 马丽萍)